GLP-1-IgG4-Fc融合蛋白的表达与鉴定[1]

陈英[2]，肖海鹏，张晓焰，龚庆伟，马利，李文佳，陈小锋

（广东东阳光药业有限公司，广东东莞 523867）

摘要 将合成的人胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1,GLP-1)突变体基因与IgG4抗体的Fc部分进行融合获得GLP-1-IgG4-Fc片段，获得的片段与pXC17.4载体进行连接，用电转化方法将线性化质粒稳定转染CHO-K1细胞，通过ClonePix 2筛选出高表达细胞株，产量达1.5 g/L。收集培养上清并经Protein A和Source 30Q纯化，得到的GLP-1-IgG4-Fc融合蛋白，SDS-PAGE纯度高于95%，HPLC纯度和CZE纯度均不低于80%，SEC纯度高于99%。经质谱和肽图谱测定，分子量与理论值一致，肽图谱序列与对照品高度一致。生物学活性分析表明，GLP-1-IgG4-Fc融合蛋白具有促进表达有GLP-1受体的HEK293细胞分泌cAMP的活性，并且该活性与对照品高度相似。

关键词 重组人胰高血糖素样肽-1；GLP-1-IgG4-Fc融合蛋白；CHO细胞；生物学活性

Expression and Characterization of Recombinant GLP-1-IgG4-FcFusion Protein[1]

CHEN Ying[2], XIAO Hai-peng, ZHANG Xiao-yan, GONG Qing-wei, MA Li, LI Wen-jia, CHEN Xiao-feng

(HEC Pharma Co.,Ltd, Guang dong, Dong guan 523867, China)

Abstract The GLP-1 mutant gene and Fc of IgG4 were fused into GLP-1-IgG4-Fc, and inserted into a mammalian expression vector pXC17.4. CHO-K1 cell was stable transfected with linearlized plasmid. High expressing clone with yield of 1.5 g/L was got through ClonePix 2. The target GLP-1-IgG4-Fc was gained with SDS-PAGE purity more than 95% after purification by Protein A and Source 30 Q. The HPLC and CZE purity of the target protein were more than 80%, and the purity was more than 99% by SEC analysis. The molecular weight was consistent with theoretical value by MS and the peptide map was the same as that of the control by peptide

[1]广东省引进创新科研团队计划资助项目（201101Y0104990178）

[2]通讯作者，电子信箱：chenying@hec.cn

mapping analysis. The biological activity analysis showed that GLP-1-IgG4-Fc stimulated cAMP production in HEK293 cell expressing GLP-1 receptors, and the biological activity was highly similar to the control.

Key words Recombinant human glucagon like peptide -1; GLP-1-IgG4-Fc fusion protein; CHO cell; Biological activity

胰高血糖素样肽-1（glucagon like peptide-1，GLP-1），又称肠促胰岛素，由肠道 L 细胞合成和分泌，属于人胰高血糖素原基因编码的一种肠促胰岛素激素。GLP-1 有两种活性形式，GLP-1（7-37）和 GLP-1（7-36）氨基化合物，两种多肽具有相同的功效和相同的半衰期。在体内通过与多器官上的 GLP-1 受体结合，通过多种不同的机制降低血糖，并已经被临床证实，其对 II 型糖尿病具有良好的治疗效果。但由于天然 GLP-1 在体内极易被二肽基肽酶（Dipeptidyl-peptidase IV，DPP-IV，EC3.4.14.5）和中性内肽酶（Neutral Endopeptidase，NEP，EC3.4.24.11）剪切其活性位点，GLP-1 在体内的半衰期极短，约 2 min[1]。

为了促使GLP-1具有成药性，不少研究者通过对GLP-1进行改造和修饰，包括进行氨基酸突变、脂肪酸化修饰、聚乙二醇修饰、与免疫球蛋白或人血清白蛋白融合表达、连接与人血清白蛋白相结合的小分子等方式，延长天然GLP-1的半衰期[2-6]。诸多研究证明，重组蛋白与人IgG抗体Fc段融合表达，形成融合蛋白即Fc融合蛋白，可以明显地提高重组蛋白的稳定性，增加其半衰期，如已经上市的依那西普和阿柏西普，不仅具有融合蛋白活性，还有较长的半衰期[5]。为了抵抗DPP-IV的降解，降低GLP-1的免疫原性，增强GLP-1的临床有效性，本文将GLP-1第2位的氨基酸由丙氨酸变成甘氨酸，第16位氨基酸由甘氨酸变成谷氨酸，第30位氨基酸由精氨酸变成甘氨酸，然后通过连接肽（GGGGSGGGGSGGGGSA）[7-9]，将GLP-1突变体与IgG4的Fc部分进行融合表达，通过体外活性研究，结果表明GLP-1-IgG4-Fc融合蛋白具有较好的生物活性，与对照品高度相似。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞

基本载体 pXC17.4（Lonza）和 *E.coli* DH5α由本实验室保藏；谷氨酰胺缺陷

型中国仓鼠卵巢细胞 CHOK1SV-KO（Lonza）由本实验室培养并冻存；GLP-1-IgG4-Fc 核酸序列由南京金斯瑞生物科技有限公司优化与合成；引物合成与测序由广州艾基生物公司生物技术有限公司完成；生物活性检测使用细胞（HEK293/GLP1R）由辉源生物科技（上海）有限公司提供。

1.1.2 药品与试剂

*Hin*d III、*Eco*R I 限制性内切酶及 T_4 DNA Ligase 购自 TaKaRa；质粒提取和 DNA 回收试剂盒购自 Omega；中提质粒试剂盒购自 life；Cellvento™ CHO-200 培养基（Merck Millipore）；CH CHO AGT 培养基（Gibco）；L-蛋氨酸砜亚胺（MSX，Sigma）；乙腈（ACN）；Trypsin（Promega）；甲酸（阿拉丁）；三氟乙酸（TFA，Merk）；SDS（Amresco）；考马斯亮蓝 R-250（Bio-Rad）；30% acrylamide（West Gene）；Precision Plus Protein™ Dual Color Standards（Bio-Rad）；FITC 标记亲和纯化山羊抗人 IgG 二抗（FITC-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG，货号 109-095-008，购自 Jackson）；融合蛋白对照品（Lilly）；cAMP 检测试剂盒（Cisbio）；其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器设备

Clone Select Image 和 ClonePix 2（Molecular Devices）；高效液相色谱仪（Agilent1260 HPLC，Agilent）；Agilent 6530 Q-TOF（Agilent）；多功能酶标仪（BMG）；冷冻离心机（Thermo）；二氧化碳培养箱（Thermo）；质谱分析 C8 和 C18 色谱柱（Agilent）；RP-C18 色谱柱（Sepax）；AKTA Avant（GE）；低速离心机（Thermo）；凝胶成像仪（Bio-Rad）；迷你双垂直电泳仪（北京六一）；高效毛细管电泳仪（Capillary Zone Electroporesis，CZE，Beckman）。

1.2 方法

1.2.1 GLP-1-IgG4-Fc 融合表达质粒的构建

按照 CHO 细胞的优化策略，对 GLP-1-IgG4-Fc 序列进行优化，同时对序列的 5′ 端添加 *Hin*d III 和 Kozak 序列（gccgccacc）、序列 3′ 端添加双终止密码子（TGATGA）和 *Eco*R I，委托金斯瑞全基因合成。合成的 pUC-57-GLP-1-IgG4-Fc 通过 *Hin*d III 和 *Eco*R I 双酶切获得 GLP-1-IgG4-Fc 片段，pXC17.4 经 *Hin*d III 和 *Eco*R I 双酶切后回收载体片段，将二者进行连接，转化 E.coli DH5α，并涂布含 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 平板，筛选阳性克隆，抽提质粒进行 PCR 鉴定、双

酶切鉴定和基因测序分析。

1.2.2 GLP-1-IgG4-Fc 融合蛋白表达质粒稳定转染 CHO 细胞及建立高表达 Pool

利用 *Pvu* I 对质粒 pXC17.4-GLP-1-IgG4-Fc 进行线性化，经纯化、过滤除菌及无菌检测后，获得线性化质粒 pXC17.4-dGLP-1-IgG4-Fc（浓度为 0.4 μg/μL）。准备 1×10^7 cells 处于指数生长期的 CHOK1SV-KO 细胞，加入到电击杯中，体积为 0.7 mL，另外加入 100 μL 浓度为 0.4 μg/uL 的线性化 DNA，按照预设程序（脉冲 300 V、900 μF，电阻∞，指数波，4 mm gap）将线性化质粒 pXC17.4-dGLP-1-IgG4 电转染至 CHOK1SV-KO 受体细胞中。电击后将细胞转至 96 孔板中，每孔 50 μL（约 5000 cells），置于恒温 CO_2 培养箱培养。培养 1 d 后，每孔加入 150 μL CD CHO AGT（含 33.3 $\mu mol\cdot L^{-1}$ MSX）培养基进行加压。培养 20 天，用 Clone Select Image 对 96 孔板进行扫描，采用非侵入性方法成像，通过白光和/或荧光（以无标记的方式）对 96 孔板进行自动扫描、快速成像和估算细胞数目，定量检测每孔细胞的汇合度（汇合度=细胞所占面积/孔板总面积）。利用 Fortebio 测定表达量，选择具有优势的 pool 依次进行 24 孔板、6 孔板扩大培养。

1.2.3 ClonePix 2 筛选亚克隆

配置添加有 FITC 荧光二抗的半固体培养基，对 6 孔板培养的高表达 Pool 进行半固体培养。培养 10 天后，采用 ClonePix 2 对克隆细胞团进行白光和荧光扫描成像，根据荧光强度、克隆间距、细胞大小以及细胞形状设定阈值，采用 ClonePix 2 的针头挑取具有优势的单克隆至 96 孔板，并接着进行 24 孔板、6 孔板扩大培养。利用 Fortebio 测定克隆表达量并计算比生产速率（Specific productivity Rate，SPR），综合表达量和 SPR 的结果，最终挑取 Clone D 于摇瓶进行表达，每天取样测定细胞生长趋势等参数，最后获取细胞上清液。

1.2.4 GLP-1-IgG4-Fc 融合蛋白的初步纯化

4℃，4000 rpm，离心 10 min 收集上清液，上样至 Protein A 层析柱中，用乙酸缓冲液进行等度洗脱，收集洗脱峰。将洗脱下的收集液调 pH 后再上样至 Source 30Q 层析柱，0-0.1 M NaCl 溶液梯度洗脱，收集目的蛋白，目的蛋白用于质量检测和鉴定。

1.2.5 GLP-1-IgG4-Fc 融合蛋白的检测和鉴定

表达量检测：细胞株的亚克隆筛选过程是利用 Fortebio 来测定表达量；摇瓶培养样品的表达量则是通过 Protein A-HPLC 来测定的。

质量检测：分别对融合蛋白样品进行 RP-HPLC、CZE、SEC 和 SDS-PAGE 分析。

鉴定：完整分子量分析：将样品稀释至 1 mg/mL，高速离心后取上清液进行液质连用分析。肽图谱分析：将样品用 Trypsin 酶解后进行液质连用分析。通过 MassHunter B.06.00 数据分析软件进行处理得到相应的分子量和氨基酸序列。

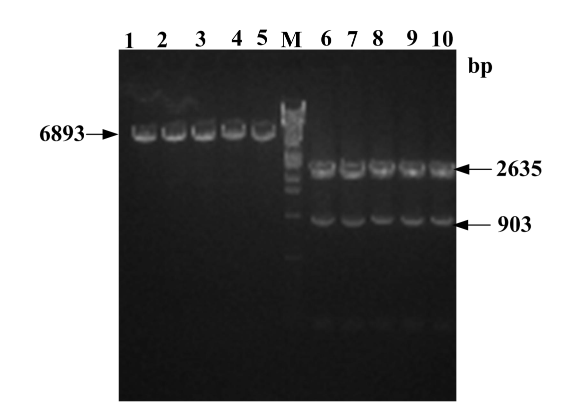
1.2.6 生物学活性测定

cAMP 测定：本分析方法是基于细胞的生物测定法。GLP-1- IgG4-Fc 融合蛋白能够激活转染有人 GLP-1 受体的 HEK293 细胞（HEK293/GLP-1R），并呈剂量依赖性地在细胞内产生 cAMP。HEK293/GLP-1R 细胞经过不同浓度的 GLP-1-IgG4-Fc 融合蛋白或对照品刺激孵育后，将其裂解，使用 CISBIO cAMP 检测试剂盒测定所产生的 cAMP，用多功能酶标仪激发平板并读数。

2 结果

2.1 GLP-1-IgG4-Fc融合蛋白表达质粒的构建及鉴定

对合成的质粒 pUC-57-GLP-1-IgG4-Fc 和基本载体 pXC17.4 进行 *Hin*d III 和 *Eco*R I 双酶切后，分别获得目的基因片段（903bp）和载体片段（6893bp）（见图 1）。通过 T4 DNA Ligase 将回收的目的基因片段和载体片段进行连接，转化 E.coli DH5α，挑取阳性克隆进行质粒抽提，并做酶切鉴定（见图 2）与测序，结果显示成功获得重组质粒 pXC17.4-GLP-1-IgG4-Fc（见图 3），对该质粒进行 *Pvu* I 线性化并用于稳定转染。



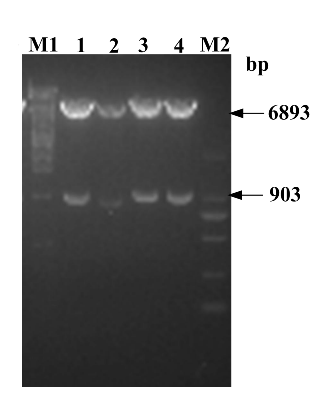


图 1 质粒 pXC17.4 和 pUC-57-GLP-1-IgG4-Fc 酶切示意图

Fig.1 Restriction pattern of pXC17.4 and pUC-57-GLP-1-IgG4-Fc

1~5: pXC17.4/*Hind* III/*Eco*R I; M:DL2000 Marker;

6~10:pUC-57-GLP-1-IgG4-Fc/*Hind* III/*Eco*R I

图 2 pXC17.4-GLP-1-IgG4-Fc 酶切示意图

Fig.2 Restriction pattern of pXC17.4-GLP-1-IgG4-Fc

M1: λ-EcoT14 I digest;

1~4:pXC17.4-GLP-1-IgG4-Fc/*Hind* III/*Eco*R I;

M2:DL2000 Marker

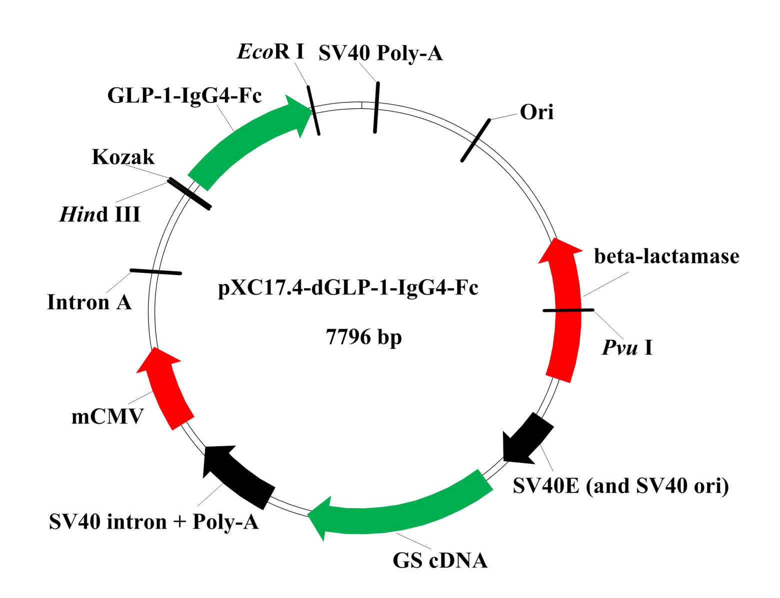


图 3 pXC17.4-GLP-1-IgG4 质粒图谱

Fig.3 Plasmid pattern of pXC17.4-GLP-1-IgG4

2.2 GLP-1-IgG4-Fc融合蛋白高表达Pool的建立

电转后铺 96 孔板，形成细胞 pool，经过约 20 天的培养，对其进行 Clone Select Image 成像（见图 4），选取汇合度≥45%的 pool，取上清液利用 Fortebio 测表达量，选择表达量≥13 μg/mL、相对表达量≥22 的 24 个 Pool 转 24 孔板和 6 孔板进行扩培。

2.3 GLP-1-IgG4-Fc 融合蛋白稳定细胞株的建立

通过对高表达 pool 进行含 FITC 荧光标记抗体的半固体培养基培养 10 天后，采用 ClonePix 2 对其进行白光和荧光扫描成像（见图 5），系统自动根据 FITC 阳性克隆外部平均荧光强度由高到低进行排序，调整细胞间距、细胞大小及细胞形态等参数，选定具有优势的单克隆。通过针头挑取优势单克隆至 96 孔板，再依次进行 24 孔板和 6 孔板扩大培养。批培养后利用 Fortebio 测表达量，同时计算 SPR 值，最终挑选到高表达菌株（399 μg/mL，40 pcd）Clone D 进行摇瓶培养，

培养 10 天后收取细胞培养液上清，最终表达量达到 1.5 g/L。

图 4 细胞 pools 的 Clone Select Image 成像示意图

Fig.4 Clone Select Image pattern of cell pools

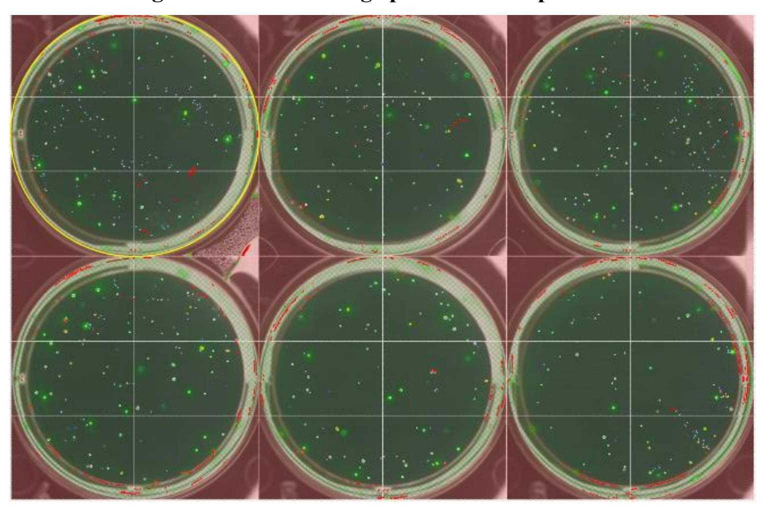


图 5 克隆半固体培养后的 ClonePix 2 成像示意图

Fig.5 ClonePix 2 pattern of clones after semisolid culturing

2.4 GLP-1-IgG4-Fc融合蛋白的初步纯化

摇瓶发酵得到的细胞培养液上清经过离心、Protein A 层析捕获和 Source30Q 两步层析纯化并分析，结果显示，RP-HPLC 纯度和 CZE 纯度不低于 80%（见图 6 和图 7），目标融合蛋白 SEC 纯度高于 99%（见图 8）。

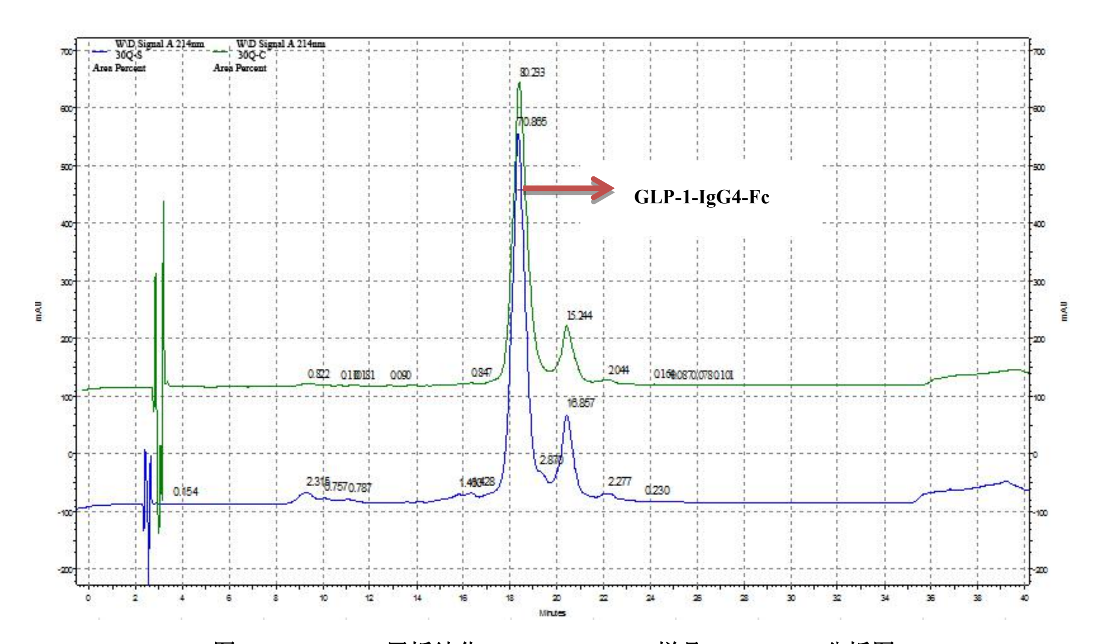


图 6 Source 30Q 层析纯化 GLP-1-IgG4-Fc 样品 RP-HPLC 分析图

上面的样品是 30Q 层析纯化得到的 GLP-1-IgG4-Fc，下面的样品是 Protein A 捕获后样品

Fig.6 RP-HPLC analysis of GLP-1-IgG4-Fc purified by Source 30Q chromatography

The sample above was GLP-1-IgG4-Fc purified by Source 30Q chromatography and the sample below was GLP-1-IgG4-Fc purified by Protein A chromatography.

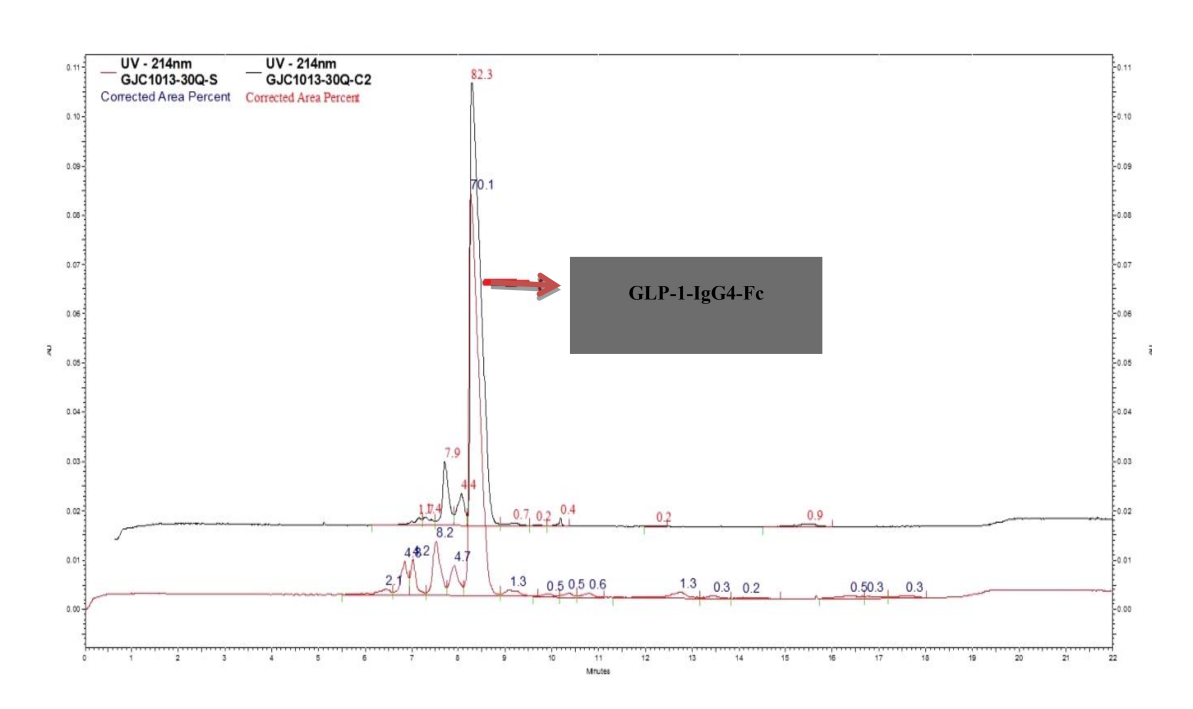


图 7 Source 30Q 层析纯化 GLP-1-IgG4-Fc 样品 CZE 分析图

上面的样品是 Q 层析纯化得到的 GLP-1-IgG4-Fc，下面的样品是 Protein A 捕获后样品

Fig.7 CZE analysis of GLP-1-IgG4-Fc purified by Source 30Q chromatography

The sample above was GLP-1-IgG4-Fc purified by Source 30Q chromatography and the sample below was GLP-1-IgG4-Fc purified by Protein A chromatography.

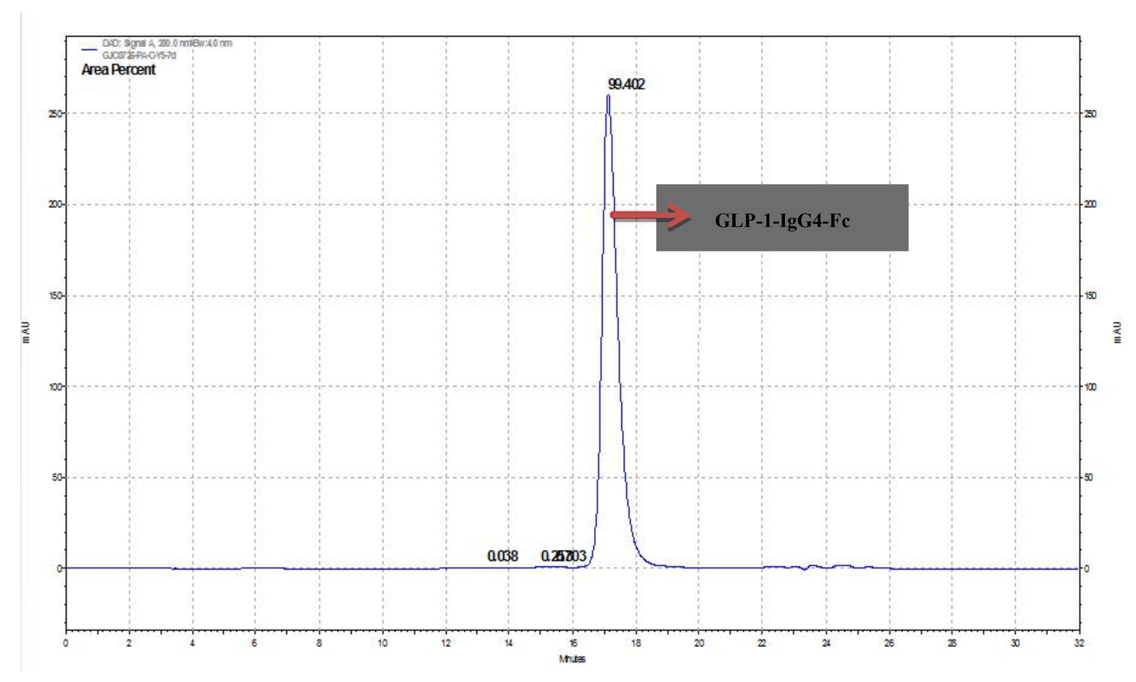


图 8 Source 30Q 层析纯化 GLP-1-IgG4-Fc 样品 SEC 分析图

Fig.8 SEC analysis of GLP-1-IgG4-Fc purified by source 30Q

2.5 GLP-1-IgG4-Fc融合蛋白的鉴定

对纯化后得到的 GLP-1-IgG4-Fc 融合蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定、质谱鉴定和肽图谱分析。SDS-PAGE 分析结果显示，目标蛋白的纯度大于 95%（见图 9）；质谱鉴定结果显示，测得的分子量主要为 62562Da（G0F/ G0F）和 62724（G0F /G1F）（见图 10），与理论分子量一致；LC-MS 分析结果表明，Trypsin 酶解后得到的氨基酸序列与对照品的氨基酸序列一致，序列覆盖率为 100%（见图 11），进一步确证了融合蛋白的序列，说明经过基因重组和纯化得到了高纯度的目标融合蛋白。

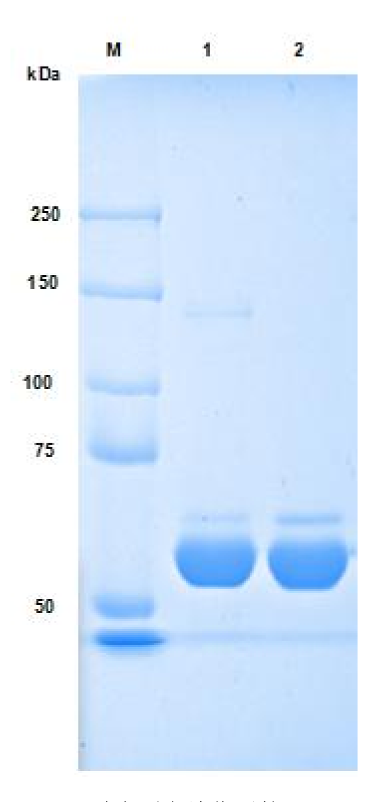


图 9 GLP-1-IgG4-Fc 融合蛋白纯化后的 SDS-PAGE 分析图谱

Fig.9 SDS-PAGE analysis of GLP-1-IgG4-Fc after purification

M：Marker；1：对照品；2：纯化后的 GLP-1-IgG4-Fc 融合蛋白

M: Marker; 1: The control; 2: GLP-1-IgG4-Fc after purification

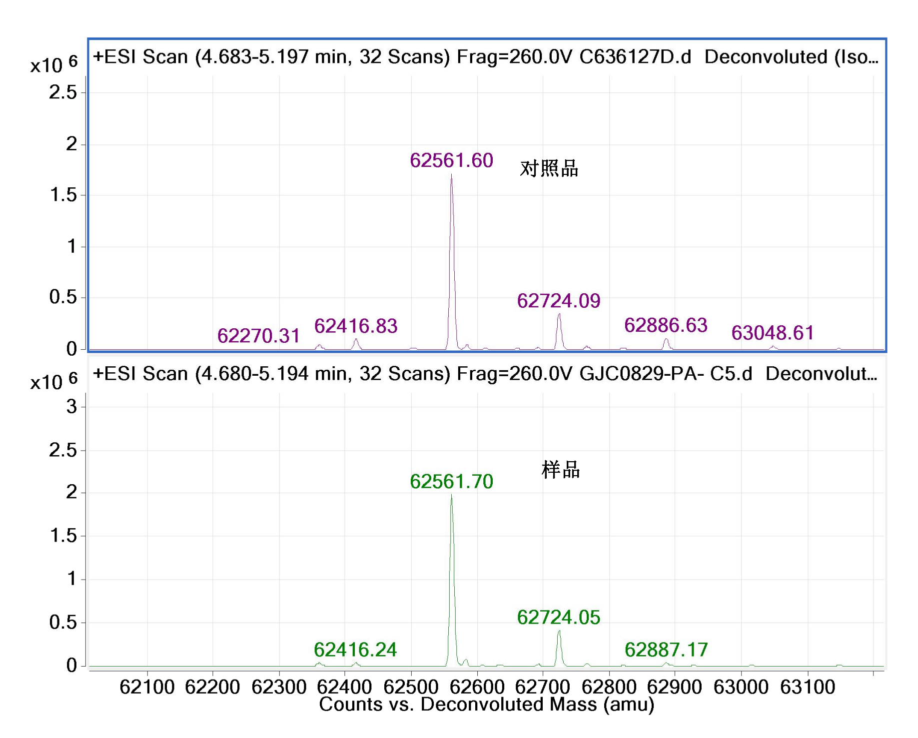


图 10 质谱测定 GLP-1-IgG4-Fc 的分子量

Fig.10 Molecular weight of GLP-1-IgG4-Fc by LC-MS

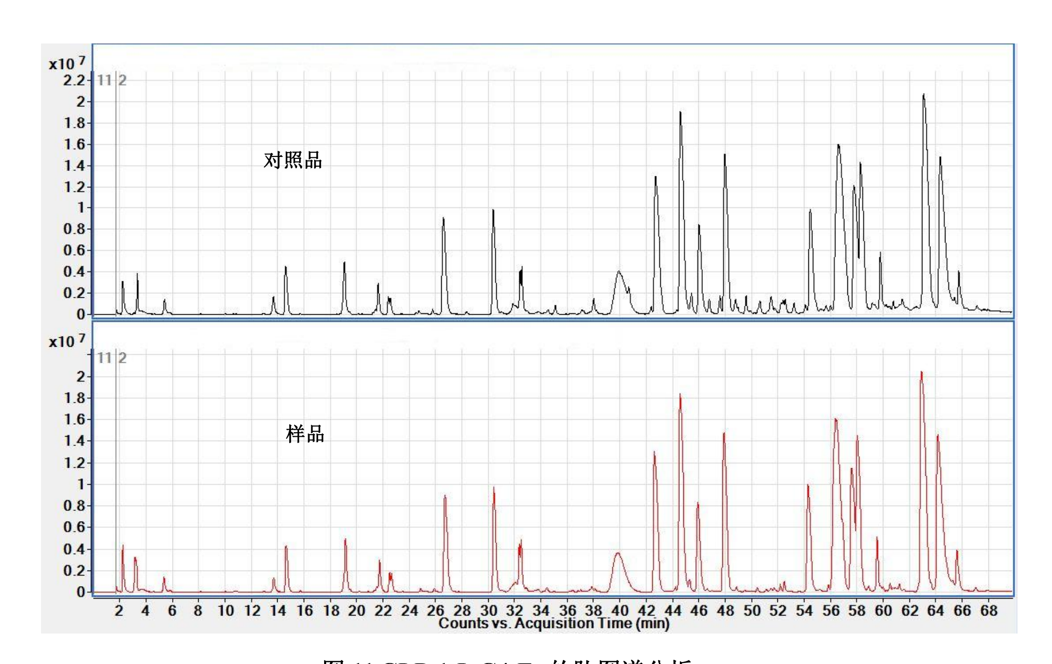


图 11 GLP-1-IgG4-Fc 的肽图谱分析

Fig.11 Peptide mapping analysis of GLP-1-IgG4-Fc

2.6 GLP-1-IgG4-Fc融合蛋白的生物活性测定

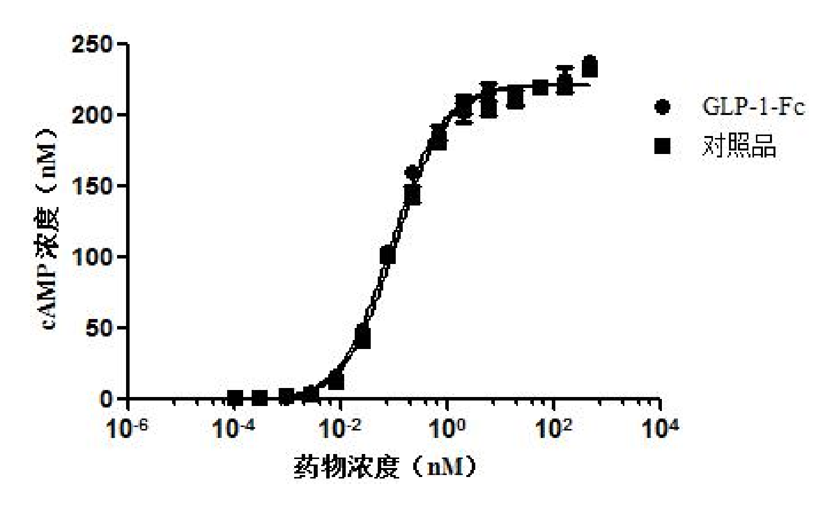


图 12 GLP-1-IgG4-Fc 的体外生物活性测定

Fig.12 Biological activity assay of GLP-1-IgG4-Fc in vitro

cAMP 测定结果如图 12 所示，GLP-1-IgG4-Fc 能够促进表达有 GLP-1 受体的 HEK293 产生 cAMP，且呈现剂量依赖关系。EC_{50} 值越低，表示其活性越高。结果表明 GLP-1-IgG4-Fc 的生物学活性与对照品高度相似。

表 1 对照品与 rGLP-1 半数效应对比

Table 1 Comparison of EC_{50} between the control and GLP-1-IgG4-Fc

	对照品	GLP-1-IgG4-Fc
EC_{50}（nM）	0.1088	0.09004

3 讨论

中国已成为全球糖尿病第一大国，糖尿病患者人数达 1.1 亿人，据世界卫生组织推测，中国糖尿病患者人数到 2040 年会从目前的 1.1 亿增加到 1.5 亿，其中 II 型糖尿病占糖尿病总人数的 90%以上[3]。目前治疗 II 型糖尿病的药物包括双胍类、磺脲类、噻唑烷二酮类、基础胰岛素、DPP-IV 抑制剂和 GLP-1 受体激动剂。II 型糖尿病患者的肠促胰岛素分泌的功能受损，GLP-1 受体激动剂可以促进胰岛素的分泌，不但具有智能降糖和减轻体重作用，而且还具有心血管保护作用，无论是单一疗法还是与其它药物联合应用，均有较好地降低血糖和保护心血管的疗效，因此该研究领域受到高度关注[10-14]。

天然 GLP-1 在体内极易被 DPP-IV 酶和中性内肽酶降解，故其在体内的半衰期极短，仅 2-5 min。本研究通过 ClonPix 2 亚克隆筛选得到表达量达 1.5 g/L 的稳定细胞株，经过 Protein A 和 Source 30 Q 层析纯化，得到 SDS-PAGE 纯度高于 95%，HPLC 和 CZE 纯度不低于 80%，SEC 纯度高于 99%的 GLP-1-IgG4-Fc 融合蛋白。通过 HPLC-MS 及肽图谱分析，分子量与理论一致，即为 62562 Da（G0F/G0F）和 62724 Da（G0F/G1F），氨基酸序列与对照品一致，覆盖率为 100%。体外活性研究表明 GLP-1-IgG4-Fc 融合蛋白具有生物活性，且与对照品高度相似。

经研究，通过 ClonePix 2 筛选高表达细胞株的方式具有可行性。此外，项目组自行开发建立基于 HEK293/GLP-1R 细胞的生物活性测定方法专属性强、重复性好，可用于 GLP-1 及其类似物体外生物活性的评价。下一步项目组将对亚克隆进行有限稀释筛选单克隆，对纯化方法进行深入的研究，同时将在动物体内考察 GLP-1-IgG4-Fc 融合蛋白的半衰期和降糖活性。综上，文中表达和鉴定融合蛋白的思路和方法适用于其它由原核或真核生物表达的生物药如多肽、蛋白质和单抗的前期研究，为产业化奠定基础。

参考文献

[1] Baggio L L, Drucker D J. Biology of incretions: GLP-1 and G1P. Gastroenterology, 2007, 132: 2131-2157

[2] 盛灵，通孔建，龙秦健等. GLP-1及其类似物治疗糖尿病的研究进展. 糖尿病新世界，2015，1: 22-23

Sheng L, Tong K J, Long Q J, et al. Research progress of GLP-1 and GLP-1 analogue in diabetes treatment.

[3] http://www.chinadaily.com.cn/interface/yidian/1120783/2016-04-12/cd_24462038.html

Diabetes New Word, 2015, 1: 22-23

[3]吴建国，吴岩斌，许惠凤等. 糖尿病治疗新药—长效化胰高血糖素样肽-1（GLP-1）及其类似物的研究进展. 海峡药学，2011，23(10) : 1-6

Wu J G, Wu Y B, Xu H F, et al. Research progress of long-acting GLP-1 and GLP-1 analogue for diabetes. Strait Pharmaceutical Journal, 2011, 23(10): 1-6

[4] 王圣钧，郁慧丽，翟琳等. 人 GLP-l-IgG Fc 融合蛋白在毕赤酵母中的高效表达. 生物技术，2011，21(4): 29-33

Wang S J, Yu H L, Di L, et al. Expression of Human GLP-1-IgG Fc Fusion Protein in *Pichiapastoris*. Biotechnology, 2011, 21(4): 29-33

[5] 黄瑞晶，王轶博，李剑. Fc 融合蛋白药物的研究进展. 黑龙江科技信息，2016，164

Huang R J, Wang Y B, Li J. Research progress of Fc fusion protein. Heilongjiang Science and Technology Information, 2016, 164

[6] Bech E M, Martos-Maldonado M C, Wismann P, et al. Peptide Half-Life Extension: Divalent, Small-Molecule Albumin Interactions Direct the Systemic Properties of Glucagon-Like Peptide1 (GLP-1) Analogues. Journal of medicinal chemistry, 2017, 60: 7434-7446

[7] Glaesner W, Vick A M, Millican R, et al. Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein. Diabetes Metab Res Rev. 2010, 26(4): 287-296

[8] Jimenez-Solem E, Rasmussen M H, Christensen M, et al. Dulaglutide, a long-acting GLP-1 analog fused with an Fc antibody fragment for the potential treatment of type 2 diabetes. Curr Opin Mol Ther. 2010, 12(6): 790-797

[9] Glaesner W, Millican Jr R L, Vick A M. GLP-1 analog fusion proteins. U.S. Patent 8, 273, 854[P], 2012-9-25

[10] Wang X L, Ye F, Li J, et al. Impaired secretion of glucagon-like peptide 1 during oral glucose tolerance test in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. Saudi Medical Journal, 2016, 37(1): 48–54

[11] Giugliano D, M.I.Maiorinno M L, Bellastella G, et al. Type 2 diabetes and cardiovascular prevention: the dogmas disputed. Endocrine, 2017, 1–5

[12] Røder M E. Major adverse cardiovascular event reduction with GLP-1 and SGLT2 agents: evidence and clinical potential. Ther Adv Chronic Dis, 2018, 9(1): 33-50

[13] Bethel M A, Patel R A, Merrill P, et al. Cardiovascular outcomes with glucagon-like peptide-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis. Lancet Diabetes Endocrinol, 2017, 8587(17): 30412-30416

[14] Morello C M. Overview of the cardiovascular benefit with diabetic agents and novel combination products for type 2 diabetes. Am J Manag Care, 2017, 23(13): S241-246